Anwendung der Ultrafiltrations-methode in der Nahrungs- und -- toxikologischen Analyse. --

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der Philosophischen Fakultät
der Georg August - Universtät zu Göttingen.

Von

Grete Wipperling
aus Elberfeld.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Elberfeld 1919.
Wuppertaler Druckerei A.-G.

Angenommen durch mathematisch-
naturwissenschaftliche Abteilung.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 1919.

Referent: Herr Prof. Dr. Windaus.

Anwendung der Ultrafiltrationsmethode in der Nahrungsmittel- und toxikologischen Analyse.

Ultrafiltration heißt ein Verfahren, durch das es gelingt, kolloidal gelöste Substanzen von ihrem Lösungsmittel zu trennen. Die Grundlage der Methode beruht darauf, daß man als Filtermaterial Membranen verwendet, die sehr viel feinporiger sind als die üblichen Filtrierpapiere, sodaß Teilchen von Dimensionen, wie man sie in kolloidalen Lösungen antrifft, zurückgehalten werden, während das Lösungsmittel hindurchgeht. Die ersten Erfolge auf diesem Gebiete wurden mit porösen Tonfiltern erzielt[1]), welche kolloidales Arsensulfid und gröbere Goldteilchen zurückhielten. Eine weit größere Bedeutung haben Filter aus Gallerte erlangt. Als solche kommen insbesondere kolloidale Kieselsäure, Gelatine und Kollodium in Betracht. So benutzte Martin[2]) poröse Tonfilterkerzen, die mit Kieselsäuregallerte oder Gelatine gedichtet waren. Malfitano wandte Säckchen aus Kollodium an[3]).

Sehr eingehend hat sich Bechhold mit der Filtration kolloidaler Lösungen beschäftigt[4]). Von ihm stammt auch die Bezeichnung Ultrafiltration. Er benutzt Filter, die aus Eisessigkollodium oder Gelatine hergestellt werden. Ihre Durchlässigkeit läßt sich innerhalb weiter Grenzen variieren, wie er u. a. an dem Verhalten gegen Hämoglobinlösungen zeigt. Allerdings erfordert sein Verfahren eine größere Apparatur, sowohl zur Herstellung der Filter, als auch zu der Ausführung der Filtration, die im allgemeinen bei hohem Druck vorgenommen werden muß. So bezeichnet denn auch Burian[5]), der sich auch mit der Konstruktion eines Ultrafiltrationsapparates beschäftigt hat, das Verfahren von Bechhold als ziemlich umständlich.

[1]) Journ. Chem. Soc. **67**, 63 (1895).
[2]) Journ. of Physiol (1896) 20.
[3]) Compt. rend. **139**, 1221 (1904).
[4]) Z. f. physik. Chem. **60**, 257—318 (1907).
[5]) Zentralbl. f. Physiol. **23**, 767.

Eine wesentliche Vereinfachung bedeutet die Methode, die Zsigmondy[6]) ausgearbeitet hat. Er benutzt als Filter Kollodiummembranen, die allerdings so dünn gewählt sind, daß durchaus nicht alle Kolloide durch sie zurückgehalten werden. Endlich hat Wo. Ostwald eine relativ leicht ausführbare Art der Herstellung und Anwendung von Kollodiumultrafiltern angegeben[7]).

Die Ultrafiltration ist viel zum Studium der Eigenschaften kolloidaler Lösungen benutzt worden. Insbesondere haben Bechhold, Zsigmondy, Fouard und andere eine ganze Reihe von Untersuchungen darüber angestellt. Zsigmondy hat das Verfahren auch für praktich analytische Zwecke anwendbar gemacht, z. B. zur Filtration feinster Niederschläge in der anorganischen quantitativen Analyse, wie $BaSO_4$ und $AgCl$[8]).

Hingegen ist die Methode zur quantitativen Bestimmung organischer Kolloide bisher kaum benutzt worden. Und doch scheint sich gerade hier ein größeres Anwendungsgebiet für sie zu finden. Denn in der Nahrungsmittelchemie und bei toxikologischen Analysen handelt es sich häufig darum, Kolloide, insbesondere Eiweißstoffe quantitativ zu bestimmen, bezw. zu entfernen. Die Methoden, die man aber für diese Zwecke besitzt, sind durchaus nicht so vollkommen, als daß nicht ein neues leistungsfähiges Verfahren hier sehr erwünscht wäre.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. Mannich habe ich mich daher damit beschäftigt, eine für diese Zwecke geeignete Methode auszuarbeiten und sie auf einige Gebiete der Nahrungsmittelchemie und der toxikologischen Analyse anzuwenden.

Es war vor allem zu untersuchen, ob sich die Entfernung von Kolloiden, insbesondere Eiweißstoffen durch Ultrafiltration mit so einfachen Hilfsmitteln durchführen ließ, daß eine praktisch brauchbare, für analytische Zwecke empfehlenswerte Methode darauf gegründet werden konnte.

Die bisher vorliegenden Versuche, das Verfahren der Ultrafiltration handlich und einfach zu gestalten,

[6]) Zeitschr. angew. Chem. (1913) 447.
[7]) Kolloid. Zeitschr. 22, 72—76.
[8]) Ber. 45, 579.

sind nicht vollkommen befriedigend. Die Apparatur von Bechhold ist viel zu kompliziert, als daß Aussicht bestände, die Ultrafiltration in der von ihm vorgeschlagenen Form in die analytische Praxis einführen zu können. Wesentlich einfacher sind die Methoden von Zsigmondy und Wo. Ostwald gestaltet. Zsigmondy bereitet seine Ultrafilter in der Weise, daß er eine dünne Kollodiumlösung auf einer Glasplatte eintrocknen läßt und die verbleibende Kollodiumschicht durch Einlegen in Wasser koaguliert. Für die Anwendung dieser Filter hat er einen besonderen Apparat konstruiert*), der aus einem dickwandigen Glastrichter, einer darauf eingeschliffenen Porzellansiebplatte und einem auf diese aufzusetzenden Glasring besteht. Auf die Porzellanplatte kommt zuerst ein Papierfilter und darüber die Kollodiummembran. Die drei Teile des Apparates werden unter Benutzung von Gummiringen durch Klemmschrauben fest zusammengefügt. Die Ultrafiltration wird mit Hilfe des Vakuums der Wasserstrahlpumpe ausgeführt. Da die Kollodiummembranen von Zsigmondy sehr zart sind, geht die Filtration zwar rasch von statten, aber es werden zahlreiche organische Kolloide durch sie nicht völlig zurückgehalten.

Wo. Ostwald benutzt die in jedem Laboratorium üblichen Porzellannutschen (Büchnersche Trichter), in denen er auf folgende Weise ein Ultrafilter erzeugt. In den Hohlrand des Trichters wird zunächst eine ätherische Lösung von Rohkautschuk eingegossen. Nach dem Verdunsten des Äthers legt man eine passende Filtrierpapierscheibe ein und klebt sie am Rande durch abermaliges Aufgießen von Kautschuklösung fest. Darauf gießt man Kollodium in die Nutsche, verteilt es gleichmäßig durch Schwenken und entfernt den Überschuß. Wenn das Kollodium soweit eingetrocknet ist, daß es nicht mehr klebt, bringt man am Rande nochmals eine Kautschukdichtung an und legt das Ganze dann einige Stunden in Wasser.

Die Ostwaldsche Methode ist zwar einfach in bezug auf die Apparatur, doch genügt sie nicht den Anforderungen, die man an eine analytische Methode stellen muß. Man hat hier keinerlei Gewähr für die

*) Zeitschr. angew. Chem. (1913), 447.

Gleichmäßigkeit der Filter, da die Menge des in der Nutsche verbleibenden Kollodiums von Fall zu Fall verschieden ist. Ferner ist eine gleichmäßige Imprägnation des Filtrierpapiers mit Kollodium kaum möglich, sodaß die Filter an verschiedenen Stellen verschiedene Dichte haben. Es gehört aber zu den Anforderungen, die an Ultrafilter für quantitative Trennungen gestellt werden müssen, vor allem, daß die Filter in ihrer ganzen Fläche homogen und unter sich gleichmäßig sind. Im übrigen muß ihre Dichte so gewählt werden, daß die jeweils in Frage kommenden Kolloide praktisch vollständig zurückgehalten werden.

Die Ostwaldsche Methode der Filterherstellung kann also hier nicht in Frage kommen. Wohl aber scheint das Gießen von Kollodium auf Glasplatten, wie es Zsigmondy empfiehlt, von Vorteil zu sein.

Die folgenden Versuche haben demgemäß als erstes zum Ziel, homogene Ultrafilter von unter sich gleicher Durchlässigkeit herzustellen.

Herstellung brauchbarer Ultrafilter.

Um in ihrer ganzen Fläche homogene Filter zu erhalten, ist es erforderlich, daß die zum Gießen benutzte Glasplatte eine vollkommen ebene Oberfläche besitzt und genau horizontal liegt. Es wurde deshalb eine Salinglasplatte benutzt, die mit Hilfe eines Nivelliergestells und einer Libelle in wagerechte Lage gebracht wurde.

Um die Filter unter sich gleichmäßig zu machen, wurde stets dieselbe Menge Kollodium verwandt, die man jedesmal bis zu demselben Punkte eintrocknen ließ. Dieser Bedingung wurde in der Weise genügt, daß man die Glasplatte zunächst tarierte, dann bei genau wagerechter Stellung eine bestimmte Menge Kollodium darauf goß, solange liegen ließ, bis das Kollodium nicht mehr klebte, dann die Glasplatte auf die Wage brachte und dort solange liegen ließ, bis das Kollodium auf ein bestimmtes Gewicht eingetrocknet war. Dann wurde die Platte zur Koagulation des Kollodiums in Wasser gelegt. Die Normierung der Filter mittels der Wage ist zwar sehr genau, aber ziemlich unbequem. Hat man bei den ersten orientierenden Versuchen die Zeit bestimmt, in der das

Kollodium bis zum festgesetzten Gewicht eintrocknet, so kann man ohne merklichen Fehler später die Zeit als Maßstab wählen, vorausgesetzt, daß die Temperaturverhältnisse sich nicht wesentlich geändert haben.

Es war nunmehr zu versuchen, welche Dichte den Filtern zweckmäßig zu geben war. Da sie hauptsächlich zur Filtration von Proteinen dienen sollten, wurde ihre Durchlässigkeit an einem Eiweißstoff, dem Hämoglobin, geprüft, welches, wie schon erwähnt, bereits von Bechhold zur Feststellung der Filterdichte vorgeschlagen worden war. Dabei zeigte sich, daß Ultrafilter, die nach der Vorschrift von Zsigmondy hergestellt waren[10]), einen großen Teil des Hämoglobins passieren ließen, also viel zu durchlässig waren. Es wurden durch Anwendung größerer Kollodiummengen dichtere Filter bereitet und in systematischen Versuchen ausprobiert, bei welchen Kollodiummengen die Filter undurchlässig für Hämoglobin wurden.

Es ergab sich, daß Filter, die auf den qcm 2 mg Nitrozellulose enthielten, noch etwas Hämoglobin durchließen, da das Filtrat schwach rötlich war. Filter mit 3 mg Nitrozellulose auf den qcm hielten alles Hämoglobin zurück. Um ganz sicher eiweißundurchlässige Filter zu haben, wurde indessen eine noch dichtere Sorte von Filtern verwandt, nämlich mit einem Gehalt von 4 mg Nitrozellulose auf den qcm. Diese erwiesen sich bei dem Vakuum der Saugpumpe auch noch als genügend durchlässig für Wasser. Sie wurden in größeren Mengen auf Vorrat hergestellt, da sie längere Zeit unter Wasser haltbar sind, am besten durch Zusatz von etwas Chloroform. Im einzelnen wurden die Versuche folgendermaßen ausgeführt.

Es wurde eine Salinglasplatte von 16 cm Durchmesser, also einer Oberfläche von 200 qcm, verwandt. Gießt man das Kollodium ohne weiteres auf die Platte, so hat man meistens große Schwierigkeiten, das Filter unversehrt davon abzuziehen, ohne es zu zerreißen. Dieser Übelstand konnte durch Anwendung eines kleinen Kunstgriffs behoben werden. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die Filter sich ganz leicht ablösen

[10]) Z. angew. Chem. (1913), 447.

lassen, wenn man die Glasplatte mit einer dünnen Seifenschicht überzieht. Dies kann in der Weise geschehen, daß man eine kleine Menge alkoholische Seifenlösung auf der Glasplatte gleichmäßig verreibt und trocknen läßt, bevor man das Kollodium aufgießt.

Die verwendete Kollodiumlösung wurde so angefertigt, daß eine Tafel Celloidin (Schering) von 40 g mit 750 ccm Äther übergossen wurde, und die Flüssigkeit mit Alkohol auf ein Liter aufgefüllt wurde. Dieses Kollodium enthielt mithin 4 mg Nitrozellulose im ccm. Will man den Gehalt an Nitrozellulose kontrollieren, so versetzt man 10 ccm Kollodium unter Umrühren tropfenweise mit 10 ccm Wasser und dampft das Ganze auf dem Wasserbade zur Trockne. Der Rückstand muß dann 0,4 g betragen.

Die angewandten Ultrafiltrationsapparate.

Zur Ausführung von Ultrafiltrationen mit Hilfe der beschriebenen Filter wurden drei Apparate benutzt und auf ihre Zweckmäßigkeit und Handlichkeit miteinander verglichen.

I. Der ältere Apparat von Zsigmondy. Er ist zwar für sehr viel dünnere Filter konstruiert worden, doch kann er für den vorliegenden Zweck benutzt werden. Dabei tritt jedoch die Schwierigkeit auf, daß wegen der dicken Filtermembranen nicht leicht ein luftdichter Schluß des Apparates zu erzielen ist. Seine Teile müssen dazu sehr fest aufeinander gepreßt werden. Dabei kann es vorkommen, daß der Glastrichter dem Druck der Klemmschrauben nicht standhält und zerspringt. Außerdem ist das Zusammenfügen des aus drei Teilen bestehenden Apparates, gegebenenfalls unter Dazwischenlegen von Gummiringen, einigermaßen lästig.[11])

II. Anwendung des Ultrafilters im Büchnerschen Trichter. In eine Porzellannutsche wird eine schwach angefeuchtete Filtrierpapierscheibe gelegt und durch die Wasserstrahlpumpe festgesogen. Sodann wird sie mit Hilfe einer geschmolzenen Mischung aus drei Teilen Öl, zwei Teilen Kolophonium und einem Teil Wachs, die man mit einem

[11]) Zeitschr. f. angew. Chem. (1913), 447.

Haarpinsel aufstreicht, in der Nutsche festgeklebt. Darauf kommt die passend zurechtgeschnittene Kollodiummembran hinein, deren Rand ebenfalls durch Aufstreichen obiger Mischung in der Nutsche festgekittet wird. Auch die Ostwaldsche ätherische Rohkautschuklösung würde sich zur Dichtung verwenden lassen. Doch war sie während des Krieges nicht zu beschaffen. Der Apparat ist bei einiger Geschicklichkeit in der beschriebenen Form recht gut brauchbar, wenn auch die jedesmalige Herrichtung einige Mühe erfordert.

III. Der neuere Ultrafiltrationsapparat von Zsigmondy-de Haen.[12]) Der Apparat besteht aus einem soliden Porzellantrichter, einer ebenen, oder nur schwach gewölbten Porzellanplatte, deren filtrierende Fläche einen Durchmesser von 10 cm hat und einem auf diese aufsetzbaren Porzellanring. Er ist besonders konstruiert worden für die in den lezten Jahren bekannt gewordenen Membranfilter von Zsigmondy und Bachmann[13]), eignet sich aber auch vorzüglich für die Kollodiumultrafilter. Die Handhabung des Apparates wurde noch vereinfacht dadurch, daß man den Trichter mit der Siebplatte luftdicht verkittete, in diesem Falle durch eine Mischung von Wasserglas und Kreide.

Zur Ausführung von Ultrafiltrationen wird der Trichter in eine Saugflasche eingesetzt und die Siebplatte mit einer Filtrierpapierscheibe von 10 cm Durchmesser belegt. Sodann schneidet man von dem Ultrafilter den äußeren Rand ab, da er meist gewellt ist, zweckmäßig in der Weise, daß man ein Uhrglas von 12 cm Durchmesser auf das Filter legt und mit der Spitze eines Messers längs dem Rande des Uhrglases die Kollodiummembran durchschneidet. Das Filter wird sodann auf die Siebplatte gelegt, deren Rand vorher eingefettet worden ist. Schließlich wird der ebenfalls eingefettete Porzellanring aufgesetzt und das Ganze evakuiert. Ist ein genügendes Vakuum erreicht (15—20 mm), so kann man den zur Saugpumpe führenden Druckschlauch mit Hilfe einer Klemmschraube

[12]) Zsigmondy u. Bachmann; Z. f. anorgan. Chem. **103**, 119.

[13]) Zu beziehen von E. de Haen, Chem. Fabrik, List, Seelze b. Hannover. Preis 31,— M. bezw. 33,50 Mk. mit gewölbter Platte. Das letztere Modell ist vorzuziehen.

verschließen und die Wasserstrahlpumpe abstellen. Haften alle Teile des Apparates luftdicht aufeinander, was leicht zu erreichen ist, so bleibt während der Ultrafiltration das Vakuum stundenlang erhalten.

Von den drei ausprobierten Apparaten ist der lezte der zweckmäßigste. Er ist dauerhaft konstruiert und einfacher zu handhaben als die anderen.

Prüfung der Ultrafilter.

Filter 1 u. 2: 2 mg Nitrozellulose auf 1 qcm. 10 ccm vierprozentiges Kollodium wurden mit 15 ccm Äther verdünnt und die Mischung auf die zuvor mit Seifenlösung gestrichene Glasplatte aufgegossen, gegebenenfalls mit Hilfe eines dünnen Glasstabs gleichmäßig verteilt. Nach dem Eintrocknen auf 2½ g wurde die Glasplatte eine Zeit in Wasser gelegt.

Filter 3 u. 4: 3 mg Nitrozellulose auf 1 qcm. Sie wurden in derselben Weise angefertigt, unter Verwendung von 15 ccm Kollodium und 10 ccm Äther. Man ließ die Filter bis auf 4 g eintrocknen.

Filter 5 u. 6: 4 mg Nitrozellulose auf 1 qcm. Sie wurden hergestellt aus 20 ccm Kollodium und 5 ccm Äther. Das Eintrocknen erfolgte bis auf 5 g, was etwa eine Viertelstunde dauerte. Die Filter wurden in dem Apparat von Zsigmondy-de Haen vergleichend geprüft, unter Verwendung einer einprozentigen wässerigen Lösung von Hämoglobin in lamellis (Merck), die zur Konservierung mit einigen Tropfen Chloroform versetzt wurde. Mit Rücksicht auf eine Bemerkung von Bechhold[14]) wurde sie erst nach 48 stündigem Stehen verwandt, da frisch bereitete Lösungen zuerst im Ultramikroskop Submikronen zeigen.

Die Filter verschiedener Dichte verhielten sich folgendermaßen:

Filter 1 u. 2 ließen eine anfangs farblose, sehr bald aber rötliche Flüssigkeit passieren, ein Beweis, daß sie Hämoglobin nicht vollständig zurückzuhalten vermochten.

[14]) Zeitschr. physik. Chem. 60, 267 (1907).

Filter 3 u. 4 ergaben nach einiger Zeit ein zwar schwach gelblich, aber nicht rötlich gefärbtes Filtrat. (Die gelbliche Färbung ist nach Bechhold nicht etwa auf durchgehendes Hämoglobin, sondern auf Zersetzungsprodukte desselben zurückzuführen.) Die letzten Filter erwiesen sich also bereits als hämoglobindicht und wären schon zur Filtration gewisser Eiweißstoffe brauchbar.

Filter 5 u. 6 zeigten dasselbe Verwalten wie Filter 3 u. 4, nur war die Filtrationsgeschwindigkeit etwas geringer. Immerhin ist sie aber noch groß genug, um Filter von dieser Dichte für praktische Zwecke verwendbar erscheinen zu lassen. Denn 100 ccm Wasser passieren ein derartiges Filter im Apparat von Zsigmondy-de Haen, der eine filtrierende Fläche von 80 qcm hat, bei einem Vakuum von 15—20 mm in einem Zeitraum von etwas über einer Stunde. Im Hinblick darauf wurden bei den späteren Versuchen im allgemeinen Filter der dichtesten Sorte mit 4 mg Nitrozellulose im qcm benutzt.

Wie sich aus den vorstehenden Ausführungen ergibt, war nunmehr die Grundlage für eine Methode gegeben, die einer praktischen Anwendung für analytische Zwecke fähig zu sein schien. Denn es war gelungen, auf einfache und bequeme Weise Kollodiumfilter herzustellen, die in allen Teilen ihrer Oberfläche gleich dicht waren, die unter sich genügend gleichmäßig ausfielen, und die sicher protein- bezw. hämoglobindicht waren. Ferner war die Methodik der Anwendung dieser Filter im Zsigmondy-de Haenschen Trichterapparat derart durchgebildet, daß die Vornahme einer Ultrafiltration eine leicht ausführbare Operation genannt werden kann. Das Verfahren wurde nunmehr auf verschiedene Gebiete der Nahrungsmittelchemie und toxikologischen Analyse angewendet. Es wurde benutzt zur Trennung von Protein- und Nichtproteinstickstoff in Nahrungs- und Futtermitteln, ferner zur Trennung von Giftstoffen und Proteinen in der toxikologischen Analyse, endlich zur Verfolgung des fermentativen Abbaues des Kaseins.

Die Trennung und quantitative Bestimmung von Protein- und Nichtproteinstickstoff in Nahrungs- und Futtermitteln durch Ultrafiltration.

In der Nahrungsmittelchemie, besonders in der Futtermittelanalyse ist es häufig erwünscht, nicht nur den Gesamtstickstoffgehalt eines Produktes, den man leicht nach der Methode von Kjeldahl bestimmen kann, zu kennen, sondern auch die Stickstoffmenge, welche in Form von wirklichen Proteinen vorhanden ist. Bisher pflegte man derartige Bestimmungen nach dem Kupferhydroxydverfahren von A. Stutzer[15]) oder nach dem einfacheren von F. Barnstein[16]) auszuführen. Beide Verfahren gehen von der Voraussetzung aus, daß die in Futtermitteln vorkommenden, nicht eiweißartigen stickstoffhaltigen Substanzen in Wasser sämtlich löslich sind, was auch zutreffend sein dürfte. Weiter wird angenommen, daß sämtliche wasserlösliche Proteinstoffe durch ausfallendes Kupferhydroxyd niedergeschlagen werden, wohingegen sämtliche nicht eiweißartige Stickstoffverbindungen nicht gefällt werden.

Die Ausführung der Bestimmung erfolgt in der Weise, daß man das Untersuchungsmaterial mit Wasser heiß auszieht, sodann ohne zu filtrieren bestimmte Mengen von Kupfersulfatlösung und Natronlauge zugibt. Wenn man nun filtriert, so sollen sich auf dem Filter alle Proteinstoffe, im Filtrat dagegen alle nicht-eiweißartigen Stickstoffverbindungen befinden. Führt man mit dem Filterinhalt eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl aus, so ergbt sich daraus diejenige Stickstoffmenge, die in Form von wirklichem Protein vorlag. Die Differenz zwischen Gesamtstickstoff und Proteinstickstoff pflegt man als Amidstickstoff zu bezeichnen.

Gegen die Barnsteinsche Methode läßt sich zunächst sagen, daß sich ihre technische Ausführung wenig angenehm gestaltet. Denn das Kupferhydroxyd fällt sehr voluminös aus, ist daher schlecht abzufiltrie-

---

[15]) Journ. f. Landwirtsch. **29**, 473 (1881).

[16]) Landw. Versuchsst. **54**, 327 (1900).

ren und äußerst schwer auszuwaschen. Wichtiger ist der Einwand, daß durchaus nicht exakt bewiesen ist, daß das Kupferhydroxyd amidartige Verbindungen nicht niederzuschlagen vermag. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann jedenfalls angenommen werden, daß das voluminöse pflanzliche Material und das Kupferhydroxyd durch Adsorption amidartige Verbindungen festhalten, sodaß ein Teil des Amidstickstoffs als Proteinstickstoff mit bestimmt wird. Dieses bisher fast ausschließlich benutzte Verfahren ist mithin keineswegs eine ideale Methode.

Hier schien nun die Ultrafiltration einen neuen Weg zur analytischen Trennung von Protein- und Nichtproteinstickstoff zu bieten. Denn, wenn auch der Begriff Eiweiß nicht exakt zu umschreiben ist, so gehört doch jedenfalls zur Eiweißnatur der Kolloidcharakter. Eine Methode, die zur Trennung von Protein und Nichtprotein den Kolloidcharakter des Eiweiß heranzieht, beruht somit auf einer sicheren Grundlage. In der Tat ist es möglich gewesen, mit Hilfe der Ultrafiltration ein Verfahren auszuarbeiten, welches anscheinend richtige Werte für Protein und Nichtprotein liefert. Die für seine Brauchbarkeit nötige Bedingung ist natürlich, daß sämtliche Eiweißstoffe vom Ultrafilter zurückgehalten werden. Daß es dieser Voraussetzung entspricht, zeigen die mit den oben beschriebenen Filtern erhaltenen Ultrafiltrate. Während die durch Papier filtrierten wässerigen Auszüge sämtlich mit Eiweißreagentien mehr oder weniger starke Fällungen gaben, war dies nach der Ultrafiltration nicht mehr der Fall. Angewandt wurden: die Kochprobe mit verdünnter Salpetersäure, die Schichtprobe mit konz. Salpetersäure, Essigsäure und Ferrocyankalium, Tannin und Aussalzen mit Ammoniumsulfat. Von diesen erwiesen sich die beiden letzteren gegenüber den untersuchten Pflanzenauszügen am empfindlichsten. In den Ultrafiltraten gaben aber auch sie keine Reaktion mehr. Erst nach vielstündigem Stehen wurde bisweilen eine ganz leichte Fällung erhalten, die aber nicht notwendigerweise auf Eiweiß zurückzuführen ist. Eine Ausnahme bildete allein ein Lupinenmehl, dessen ultrafiltrierter Auszug mit Tannin eine deutliche Fällung gab. Diese Erscheinung dürfte aber nicht auf durchgegangenes Protein, als

vielmehr auf den Alkaloidgehalt der Lupinen zurückzuführen sein.

Die Ausführung der Analyse gestaltet sich im einzelnen folgendermaßen.

3 g Substanz übergißt man in einem Becherglas mit 100 ccm Wasser, stellt das Gewicht fest und kocht auf, bezw. erwärmt 10 Minuten im Wasserbad auf 60°, wenn es sich um stärkereiche Substanzen handelt. Nach dem Erkalten ergänzt man das verdampfte Wasser und filtriert. Sodann unterwirft man den Auszug der Ultrafiltration durch ein Kollodiumfilter (4 mg Nitrozellulose auf 1 qcm). Die ersten 15—20 ccm des Ultrafiltrats verwirft man, weil sie verdünnt sind durch das im Ultrafilter befindliche Wasser und weil ferner den ersten Anteilen stickstoffhaltige Substanzen durch Adsorption seitens des Ultrafilters entzogen sein können. Von dem weiterhin erhaltenen Filtrat benutzt man 50 ccm = 1,5 g Substanz zur Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl. Man erhält auf diese Art die Stickstoffmenge, die in Form von Nichtprotein vorhanden ist. Hat man zuvor den Gehalt an Gesamtstickstoff ermittelt, so ergibt sich aus der Differenz der Proteinstickstoff.

Zur Untersuchung gelangten sieben Futtermittel, 1. Pferdebohnen (vicia faba), 2. Lupinen, 3. Mohrrüben, 4. Bohnenmehl, 5. Kartoffelflocken, 6. Baumwollsamenmehl, 7. Weizenschrot.

Besondere Schwierigkeiten bei der Analyse traten in keinem Falle auf. Die Ultrafiltration ließ sich stets glatt durchführen. 50 ccm Ultrafiltrat waren meistens in etwa einer Stunde erzielt; nur bei stärkehaltigen Produkten wurden etwa zwei Stunden benötigt.

Es wurden bestimmt: 1. der Gesamtstickstoff des Futtermittels, 2. der wasserlösliche Stickstoff im durch Papier filtrierten Auszuge, 3. der im Ultrafiltrat enthaltene Stickstoff, 4. zum Vergleich der Reinproteinstickstoff nach Barnstein. Die Differenz von 1. und 3. ergibt den Reinproteinstickstoff nach der Ultrafiltrationsmethode, die Differenz von 2. und 3. bedeutet den durch die Ultrafiltration aus der wässerigen Lösung entfernten Proteinstickstoff.

Die sämtlichen Analysen wurden nach der Kjeldahlschen Methode ausgeführt. Die erhaltenen Resultate sind im folgenden zusammengestellt.

I. Pferdebohnen.

	angew. Menge in g	geb. H_2SO_4 in ccm	1 ccm Säure = mg N	N-Gehalt in %	Mittel
1. Gesamt-N	1,01	9,08	3,25	2,922	2,947
	1,06	9,69	3,25	2,971	
2. N im Papierfiltrat	2,0	6,4	3,25	1,041	1,044
	2,0	6,45	3,25	1,048	
3. N im Ultrafiltrat	2,0	5,6	3,25	0,910	0,906
	2,0	5,55	3,25	0,9019	
4. Reinprotein nach Barnstein	1,015	6,75	3,762	2,502	2,504
	1,051	7,0	3,762	2,506	

Verhalten des wässerigen Auszuges gegen Eiweißreagentien.

Reagenz	Papierfiltrat	Ultrafiltrat
Kochen mit verd. HNO_3	—	—
Schichten mit konz. HNO_3	—	—
Essigsäure und $FeCy_6K_4$	ganz schwache Trübung	—
Tanninlösung	dicke Fällung	g. kleine Fällung nach stundenl. Stehen
Sättigen mit $(NH_4)_2SO_4$	dicke Fällung	—

II. Lupinen.

	angew. Menge in g	geb. H_2SO_4 in ccm	1 ccm Säure = mg N	N-Gehalt in %	Mittel
1. Gesamt-N	0,975	19,15	3,762	7,39	7,38
	1,1053	21,65	3,762	7,37	
2. N im Papierfiltrat	1,5	9,85	3,25	2,134	2,133
	1,676	11,0	3,25	2,133	
3. N im Ultrafiltrat	1,5	4,55	3,25	0,9858	0,9804
	1,5	4,5	3,25	0,9750	
4. Reinprotein nach Barnstein	1,522	30,65	3,25	6,545	6,518
	0,7161	14,3	3,25	6,490	

Verhalten des wässerigen Auszuges gegen Eiweißreagentien.

Reagenz	Papierfiltrat	Ultrafiltrat
Kochen mit verd. HNO_3	starke Trübung, beim Kochen klar	—
Schichten m. konz. HNO_3	dicker weißer Ring	—
Essigsäure und $FeCy_6K_4$	dicke Trübung	—
Tanninlösung	dicke Fällung	schwache aber deutl. Fällung
Sättigen mit $(NH_4)_2SO_4$	starke Trübung	—

III. Mohrrüben.

	angew. Menge in g	geb. H_2SO_4 in ccm	1 ccm Säure = mg N	N-Gehalt in %	Mittel
1. Gesamt-N	2,020	6,6	3,762	1,23	1,203
	2,191	6,85	3,762	1,175	
2. N im Papierfiltrat	1,50	2,2	3,762	0,5518	0,5681
	1,384	2,15	3,762	0,5844	
3. N im Ultrafiltrat	1,50	1,6	3,762	0,4013	0,405
	1,384	1,5	3,762	0,4077	
4. Reinprotein nach Barnstein	2,005	5,1	3,762	0,9424	0,9497
	1,996	5,0	3,762	0,9569	

Verhalten des wässerigen Auszuges gegen Eiweißreagentien.

Reagenz	Papierfiltrat	Ultrafiltrat
Kochen mit verd. HNO_3	—	—
Schichten mit konz. HNO_3	—	—
Essigsäure und $FeCy_6K_4$	—	—
Tanninlösung	dicke Fällung	—
Sättigen mit $(NH_4)_2SO_4$	deutliche Trübung	—

IV. Bohnenmehl.

	angew. Menge in g	geb. H_2SO_4 in ccm	1 ccm Säure = mg N	N-Gehalt in %	Mittel
1. Gesamt-N	1,045	5,9	3,762	2,114	2,096
	1,005	5,55	3,762	2,077	
2. N im Papierfiltrat	1,0	1,1	3,762	0,4138	0,4138
	1,0	1,1	3,762	0,4138	
3. N im Ultrafiltrat	1,0	0,65	3,762	0,2445	0,2539
	1,0	0,7	3,762	0,2634	
4. Reinprotein nach Barnstein	1,059	5,55	3,762	1,972	1,976
	1,007	5,30	3,762	1,980	

Verhalten des wässerigen Auszuges gegen Eiweißreagentien.

Reagenz	Papierfiltrat	Ultrafiltrat
Kochen mit verd. HNO_3	trübe, beim Aufkochen klar, dann wieder trübe	—
Schichten mit konz. HNO_3	weißer Ring	—
Essigsäure und $FeCy_6K_4$	dicke Fällung	—
Tanninlösung	dicke Fällung	—
Sättigen mit $(NH_4)_2SO_4$	dicke Fällung	—

V. Kartoffelflocken.

	angew. Menge in g	geb. H_2SO_4 in ccm	1 ccm Säure = mg N	N-Gehalt in %	Mittel
1. Gesamt-N	2,004	5,55	3,762	1,042	1,022
	2,002	5,65	3,762	1,002	
2. N im Papierfiltrat	1,5	2,64	3,762	0,6621	0,6559
	1,5	2,59	3,762	0,6496	
3. N im Ultrafiltrat	1,5	1,94	3,762	0,4866	0,4866
	1,5	1,94	3,762	0,4866	
4. Reinprotein nach Barnstein	1,528	3,4	3,762	0,837	0,822
	1,634	3,5	3,762	0,806	

Verhalten des wässerigen Auszuges gegen Eiweißreagentien.

Reagenz	Papierfiltrat	Ultrafiltrat
Kochen mit verd. HNO_3	nach einigem Stehen weiße Fällung	—
Schichten mit konz. HNO_3	ganz dünner Ring	—
Essigsäure und $FeCy_6K_4$	—	—
Tanninlösung	dicke Fällung	—
Sättigen mit $(NH_4)_2SO_4$	dicke Fällung	—

VI. Baumwollsamenmehl.

	angew. Menge in g	geb. H_2SO_4 in ccm	1 ccm Säure = mg N	N-Gehalt in %	Mittel
1. Gesamt-N	1,578	35,15	3,562	7,935	7,883
	1,608	35,4	3,562	7,841	
2. N im Papierfiltrat	1,5	4,7	3,562	1,116	1,110
	1,5	4,65	3,562	1,104	
3. N im Ultrafiltrat	1,5	1,15	3,562	0,273	0,285
	1,5	1,25	3,562	0,297	
4. Reinprotein nach Barnstein	1,606	34,45	3,562	7,641	7 536
	1,630	34,0	3,562	7,430	

Verhalten des wässerigen Auszuges gegen Eiweißreagentien.

Reagenz	Papierfiltrat	Ultrafiltrat
Kochen mit verd. HNO_3	—	—
Schichten mit konz. HNO_3	dicker weißer Ring	—
Essigsäure und $FeCy_6K_4$	starke Trübung	—
Tanninlösung	dicke Fällung	—
Sättigen mit $(NH_4)_2SO_4$	dicke Fällung	—

VII. Weizenschrot.

	angew. Menge in g	geb. H_2SO_4 in ccm	1 ccm Säure = mg N	N-Gehalt in %	Mittel
1. Gesamt-N	1,484	9,3	3,562	2,232	2,217
	1,675	10,35	3,562	2,201	
2. N im Papierfiltrat	1,5	1,78	3,562	0,4227	0,4134
	1,5	1,7	3,562	0,404	
3. N im Ultrafiltrat	1,5	0,6	3,562	0,1425	0,1401
	1,5	0,58	3,562	0,1377	
4. Reinprotein nach Barnstein	1,535	9,29	3,562	2,151	2,158
	1,574	9,55	3,562	2,161	

Verhalten des wässerigen Auszuges gegen Eiweißreagentien.

Reagenz	Papierfiltrat	Ultrafiltrat
Schichten mit konz. HNO_3	weißer Ring	—
Essigsäure und $FeCy_6K_4$	deutliche Trübung	—
Tanninlösung	dicke Fällung	—
Sättigen mit $(NH_4)_2SO_4$	deutliche Fällung	—

Vergleich der nach dem Verfahren von Barnstein gefundenen Werte mit den nach der Ultrafiltrationsmethode erhaltenen Resultaten für Reinproteinstickstoff.

Futtermittel	Protein-N nach Barnstein	Protein-N n. d. U.-F.-Methode	Differenz
1. Pferdebohnen . . .	2,504 %	2,041 %	0,463
2. Lupinen	6,518 %	6,3996 %	0,118
3. Mohrrüben	0,950 %	0,798 %	0,152
4. Bohnenmehl . . .	1,976 %	1,842 %	0,134
5. Kartoffelflocken . .	0,882 %	0,535 %	0,287
6. Baumwollsamenmehl	7,536 %	7,598 %	0,062
7. Weizenschrot . . .	2,158 %	2,077 %	0,081

Wie sich aus der vorstehenden Tabelle ergibt, stimmen die nach der Ultrafiltrationsmethode gefundenen Werte mit den nach dem Barnsteinschen Verfahren erhaltenen nicht vollständig überein. Die Unterschiede sind sogar zum Teil beträchtlich. Fast durchweg ergibt die Ultrafiltrationsmethode einen niedrigeren Gehalt an Protein als die Bestimmung

nach Barnstein. Das erklärt sich daraus, daß die den beiden Methoden möglicherweise anhaftenden Fehlerquellen nach verschiedenen Richtungen hin wirken. Bei dem Barnsteinschen Verfahren kommen als Fehlerquellen in Betracht Ausfällung von Nichtprotein durch Kupferhydroxyd, bezw. Adsorption durch den voluminösen Niederschlag. In beiden Fällen würde Nichtprotein als Protein bestimmt werden, der Gehalt an Reinprotein mithin zu hoch gefunden werden. Bei der Ultrafiltrationsmethode aber könnte der alleinige Fehler der sein, daß Eiweiß mit ins Ultrafiltrat gelangt und dann als Amidstickstoff mitbestimmt werden würde. Dadurch würde sich für Reinproteinstickstoff ein zu niedriger Wert ergeben. Dieses einzige gegen die Ultrafiltrationsmethode vorzubringende Bedenken fällt aber praktisch fort, da bei den sieben untersuchten Produkten im Ultrafiltrat mit den empfindlichsten Eiweißreagentien Protein in keinem Falle sicher nachzuweisen war.

Es ergibt sich also der Schluß, daß in der Nahrungs- und Futtermittelanalyse die quantitative Bestimmung des Reinprotein- und Nichtproteinstickstoffs nach der Ultrafiltrationsmethode zuverlässigere Werte gibt, als das bisher gebräuchliche Barnsteinsche Verfahren. Außerdem hat sie den Vorzug, in der Ausführung einfacher und angenehmer zu sein als die ältere Methode.

Versuche zur Anwendung der Ultrafiltration in der toxikologischen Analyse.

Es schien, als ob die Ultrafiltration sich mit Vorteil für die toxikologische Analyse würde anwenden lassen, da es sich hier meist um Untersuchungsobjekte handelt, die reich an Kolloiden, insbesondere Eiweiß sind. Es würde eine recht einfache Methode entstehen, wenn es gelingen würde, Auszüge des Untersuchungsmaterials durch Ultrafiltration soweit zu reinigen, daß die erhaltenen Filtrate direkt zum Nachweis der Metallgifte oder zur Ausschüttelung von Alkaloiden und ähnlichen Stoffen geeignet wären. Versuche, die in dieser Absicht angestellt wurden, haben kein völlig befriedigendes Resultat ergeben.

Versuche zur Anwendung der Ultrafiltrationsmethode für den Nachweis von Alkaloiden.

Alkaloide werden bekanntlich sehr leicht durch Adsorption festgehalten. Da nun die Kollodiumfilter aus einer gallertartigen Masse bestehen, und somit Oberflächenwirkungen wahrscheinlich sind, so wurden zunächst Versuche angestellt, ob wässerige Alkaloidlösungen beim passieren des Ultrafilters wirksame Substanz verlieren. Das ist tatsächlich in nicht unerheblichem Maße der Fall, obgleich relativ dünne Ultrafilter verwendet wurden, die nur 1—1,5 mg Nitrozellulose auf 1 qcm enthielten. Die filtrierende Fläche betrug stets etwa 80 qcm.

1. Versuche mit Chinin. 5 mg Chininhydrochlorid wurden in 100 ccm Wasser gelöst und in Portionen von 10 ccm ultrafiltriert. In den ersten drei Filtraten war nach der Ultrafiltration keine Spur Alkaloid nachweisbar. Erst die 4. Probe schmeckte bitter und fluoreszeierte mit verdünnter Schwefelsäure. Es war also mindestens 1,5 mg Chinin adsorbiert worden.

2. Versuche mit Morphin. Von einer Lösung von 5 mg Morphinhydrochlorid in 100 ccm Wasser wurden wieder je 10 ccm ultrafiltriert. Die Filtrate wurden eingedampft und der Rückstand mit Formalinschwefelsäure geprüft. Erst die 2. Probe zeigte schwache Violettfärbung. Adsorbiert wurden also 0,5—1 mg.

3. Versuche mit Atropin. Eine Lösung von 5 mg Atropinsulfat in 100 ccm Wasser wurde in derselben Weise behandelt. Die nach dem Eindampfen verbleibenden Rückstände gaben vom 3. Anteil an die Vitalische Reaktion. Es war also 1 mg vollständig adsorbiert.

4. Codein. Die Versuche wurden in derselben Weise ausgeführt wie vorher. Die 3. Probe gab mit Formalinschwefelsäure schwache Blaufärbung. Die Adsorption betrug mindestens 1 mg.

5. Strychnin. Bei der Ultrafiltration einer Lösung von 5 mg Strychninnitrat in 100 ccm Wasser trat erst von der 4. Probe ab bitterer Geschmack auf. Adsorption mindestens 1,5 mg.

6. Veratrin. Eine unter Zusatz von etwas Salzsäure bereitete Lösung von 5 mg Veratrin in 100 ccm Wasser ließ bei der Prüfung mit konz. Schwefelsäure erst in der 3. Probe die Gegenwart von Veratrin erkennen. Adsorption über 1 mg.

7. Salizylsäure. Wie zu erwarten war, war hier die Adsorption weit geringer als bei den Alkaloiden. Bei der Ultrafiltration einer Lösung von 5 mg Salizylsäure in 100 ccm Wasser war bereits in den ersten Anteilen Filtrat durch die Eisenchloridreaktion Salizylsäure schwach nachweisbar.

Wie sich aus diesen Versuchen ergibt, ist die Adsorption der Alkaloide recht beträchtlich. Sie läßt sich herabsetzen, wenn man nicht rein wässerige, sondern alkoholhaltige Lösungen filtriert. So wurden in 20 prozentigem Alkohol nur 1 mg Chinin, 1 mg Strychnin und 0,5 mg Veratrin adsorbiert. Auch die Gegenwart von Weinsäure verringert die Adsorption nicht unerheblich. Nach diesen Vorversuchen, bei denen 1—2 mg Alkaloid verloren gehen, hätte man Bedenken tragen müssen, die Ultrafiltrationsmethode für toxikologische Zwecke auch nur in Betracht zu ziehen, wenn nicht in praktischen Fällen die Verhältnisse günstiger lägen. Denn hier handelt es sich nie um rein wässerige Alkaloidlösungen, sondern vielmehr stets um Flüssigkeiten, die reichlich andere adsorbierbare Stoffe enthalten. Das Adsorptionsvermögen kommt also nicht ausschließlich den Alkaloiden gegenüber zur Geltung. Wenn es sich nicht um den Nachweis von Spuren derselben handelt, dürfte die Ultrafiltrationsmethode brauchbar sein. Ein Versuch, der mit Codein und Salizylsäure in Fleisch durchgeführt wurde, hat ein befriedigendes Resultat ergeben.

50 g Fleisch wurden mit 5 mg Codeinphosphat und 5 mg Salizylsäure versetzt und über Nacht stehen gelassen. Darauf wurde die Masse mit 125 ccm Wasser angerührt, etwas Weinsäure hinzugesetzt, bis zum folgenden Tag stehen gelassen und durch ein Tuch abgepreßt. Die erhaltene Flüssigkeit wurde aufgekocht, filtriert, ultrafiltriert und das noch sauer reagierende Ultrafiltrat auf 15 ccm eingedampft. Die Lösung wurde dann mit Äther ausgeschüttelt, was nach Zusatz von Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion wiederholt wurde. Die wässerige Lösung

erwies sich durch die Ultrafiltration soweit gereinigt, daß das Ausschütteln keine Schwierigkeiten bot. Der ätherische Auszug aus saurer Lösung hinterließ beim Verdunsten einen Rückstand, der sich mit Eisenchloridlösung dunkel violett färbte und sich dadurch als Salizylsäure zu erkennen gab. Der Ätherauszug aus alkalischer Lösung lieferte einen geringen harzigen Rückstand, der beim Übergießen mit Formalinschwefelsäure die charakteristische blauviolette Codeinreaktion gab.

Versuche zur Anwendung der Ultrafiltrationsmethode für den Nachweis von Metallgiften.

Wenn auch Metallsalze nicht so leicht der Adsorption unterliegen, wie Alkaloide, so ist doch bekannt, daß z. B. Tierkohle Schwermetalle wie Blei und Gold festzuhalten vermag. Es mußte deshalb versucht werden, ob Metalle aus wässerigen Lösungen adsorbiert würden. Benutzt wurden relativ dünne Ultrafilter mit 1—1,5 mg Nitrozellulose auf 1 qcm und 80 qcm filtrierender Fläche. Die Ergebnisse sind die folgenden:

1. Blei. Eine Lösung von 0,016 g Bleinitrat in 1 Liter Wasser wurde in Anteilen von je 10 ccm ultrafiltriert. Erst nachdem 130 ccm durch das Filter gegangen waren, trat im Filtrat mit farblosem Schwefelammon Braunfärbung auf, d. h. es waren 1,3 mg Blei adsorbiert worden. Zur Kontrolle wurde der Versuch mit einer zehnfach konzentrierteren Bleilösung, die im Liter 100 mg Blei enthielt, wiederholt. Beim Filtrieren von je 5 ccm blieb die Prüfung mit Schwefelammon bei den ersten drei Proben negativ, erst bei der 4. Probe trat Braunfärbung auf. Daraus ergibt sich eine Adsorption von 1,5 mg Blei.

2. Quecksilber. In derselben Weise wurde eine Lösung von Quecksilberchlorid mit einem Gehalt von 100 mg Quecksilber im Liter untersucht. Es zeigte sich, daß die ersten 15 ccm quecksilberfrei waren. Danach trat die Reaktion mit Zinnchlorür auf, d. h. es hatte eine Adsorption von 1,5 mg Quecksilber stattgefunden.

3. Kupfer. Weniger stark wird Kupfersulfat adsorbiert. Eine Lösung, welche 100 mg Kupfer im Liter enthielt, zeigte bei der Ultrafiltration in den

ersten 5 ccm keine Reaktion mit Kaliumferrocyanid. In den folgenden 5 ccm war sie unsicher; dann trat sie deutlich ein. Adsorption 0,5—1 mg.

4. Zink. Eine Lösung von Zinksulfat mit einem Gehalt von 100 mg Zink im Liter ergab in den ersten 10 ccm Ultrafiltrat bereits eine schwache Reaktion mit Kaliumferrocyanid. Adsorption unter 1 mg.

5. Arsenige Säure. Es wurde eine Lösung von arseniger Säure, die im Liter 10 mg enthielt, angefertigt. Ein Teil derselben wurde mit 7 Teilen Wasser und 2 Teilen 25 prozentiger arsenfreier Salzsäure verdünnt, sodaß die Konzentration der Lösung $1 : 10^6$ betrug. Die Lösung ergab bei der Ultrafiltration in den ersten 10 ccm deutlich die Gutzeitsche Reaktion. Eine merkliche Adsorption von arseniger Säure findet also nicht statt.

Zur Kontrolle, ob die verwendeten Reagentien und Apparate arsenfrei waren, wurde in derselben Weise ein blinder Versuch ausgeführt, der völlig negativ ausfiel.

6. Arsensäure. Ebenso wurde eine Lösung von Arsensäure ($1 : 10^6$) auf Adsorption geprüft. Auch hier fiel der blinde Versuch negativ aus, während die ersten 10 ccm des Ultrafiltrats die Gutzeitsche Reaktion deutlich ergaben.

7. Antimon. Eine Brechweinsteinlösung, die 10 mg Antimon im Liter enthielt, ergab ein Ultrafiltrat, dessen erste 10 ccm mit Schwefelwasserstoffwasser deutliche Gelbfärbung zeigten. Eine Adsorption von Antimon kann kaum stattfinden.

Zur praktischen Erprobung der Ultrafiltrationsmethode wurde ein Bückling mit 5 mg As_2O_3, 10 mg $Pb(NO_3)_2$, 5 mg $CuSO_4$ und 5 mg Strychninnitrat zerrieben, die Masse mit 150 ccm zweiprozentiger Salzsäure bei 40° längere Zeit extrahiert und der ungelöste Anteil abfiltriert. Die Flüssigkeit wurde durch ein Ultrafilter (2,5 mg Nitrozellulose auf 1 qcm) filtriert, mit Natronlauge alkalisch gemacht und dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherrückstand gab deutlich die Strychninreaktion mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure.

Die mit Äther ausgeschüttelte wässerige Flüssigkeit wurde mit Salzsäure wieder angesäuert, mit Schwefelwasserstoff heiß gesättigt und über Nacht

stehen gelassen. Der gut filtrierbare Niederschlag wurde nach der üblichen Methode analysiert. Blei, Kupfer und Arsen konnten mit aller Sicherheit gefunden werden.

Wenn auch die Analyse ein befriedigendes Resultat ergeben hat, soll damit die Methode für den Nachweis von Metallgiften nicht allgemein empfohlen werden. Abgesehen davon, daß Verluste von Schwermetallen durch Adsorption unvermeidlich sind, treten noch besondere Schwierigkeiten beim Quecksilber ein. Dieses findet sich mit Eiweiß meist in so fester komplexer Bindung, daß es durch verdünnte Säure nicht aus dem Untersuchungsobjekt herausgelöst wird. In der Tat haben Versuche mit Fleisch, dem Quecksilbersalze beigemischt waren, wiederholt ergeben, daß das Quecksilber in einem salzsauren ultrafiltrierten Auszuge nicht mit Sicherheit wiederzufinden war. In diesem Falle scheint man also ohne eine Zerstörung der organischen Substanz nicht auszukommen. Es wird weiterer Versuche bedürfen, um festzustellen, wie weit die Ultrafiltration zur Reinigung von kolloidhaltigen Lösungen brauchbar ist, wenn es sich um den Nachweis von Schwermetallen handelt.

Versuche zur Anwendung der Ultrafiltrationsmethode für den Nachweis von Kaliumchlorat und Oxalsäure.

Kaliumchlorat und Oxalsäure pflegt man dem Untersuchungsmaterial durch Dialyse zu entziehen. Es läßt sich dabei nicht vermeiden, daß die Dialysate stark verdünnt werden. Hier schien die Ultrafiltration geeignet, rascher und bequemer zum Ziel zu kommen. Diese Vermutung hat sich bestätigt. Auf geringe Verluste durch Adsorption brauchte hier keine Rücksicht genommen zu werden. Denn es handelt sich bei toxikologischen Fällen kaum jemals um den Nachweis von 1—2 mg dieser Stoffe. Übrigens würden bei der Dialysiermethode auch Adsorptionserscheinungen in Frage kommen. Die ausgeführten Versuche werden im folgenden kurz beschrieben.

1. Kaliumchlorat. 50 g Brot und 25 g fein zerkleinerte Fleischteile wurden mit einer Lösung von 0,05 g $KClO_3$ zu einem dünnen Brei angerieben. Diese Mischung blieb 1½ Tage stehen. Dann wurde sie mit

100 ccm Wasser angerührt und durch ein Tuch abgepreßt. Die trübe und schleimige Flüssigkeit wurde ultrafiltriert. Das so erhaltene blanke Filtrat diente zur Prüfung auf $KClO_3$ mittels der Schwefligsäure-Indigoreaktion. 10 ccm des Filtrats wurden mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, ein Tropfen Indigolösung hinzugegeben und die blaue Flüssigkeit mit etwas schwefliger Säure versetzt. Im Verlauf von 2 Minuten trat völlige Entfärbung ein.

2. Oxalsäure. In derselben Weise wie vorher wurde ein Brei aus 25 g gut zerkleinertem Fleisch und 50 g Brot mit 100 ccm Wasser und 0,05 g Oxalsäure angerührt. Nach längerem Stehen wurde mit Salzsäure angesäuert, durch ein Tuch gepreßt und die durchgehende schleimige Flüssigkeit ultrafiltriert. 10 ccm des klaren Filtrats dienten zum direkten Nachweis von Oxalsäure. Nach Übersättigen mit Ammoniak trat auf Zusatz von Calciumchlorid allmählich die Fällung von Calciumoxalat ein. Um die Oxalsäure ganz sicher nachzuweisen, wurden weitere 25 ccm des Ultrafiltrats dreimal mit je 50 ccm Äther ausgeschüttelt. Der beim Abdestillieren des Äthers verbleibende geringe Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und wie vorher auf Oxalsäure geprüft. Das erhaltene Calciumsalz wurde durch die Kristallform identifiziert.

Zusammenfassung der Resultate.

Wenn auf Grund der angeführten Versuche ein abschließendes Urteil auch nicht gefällt werden kann, so läßt sich doch schon sagen, daß die Ultrafiltrationsmethode in der toxikologischen Analyse einer allgemeinen Anwendung nicht fähig ist. Denn es können Verluste von Alkaloiden und Schwermetallen durch Adsorption dieser Substanzen seitens der Kollodiummembranen entstehen. Diese Verluste werden zwar, wenn man in der hier beschriebenen Weise arbeitet, 1 mg wirksame Substanz kaum überschreiten. Das ist aber schon zu viel, wenn es sich um den Nachweis von Spuren von Giften handelt. Bei Quecksilber können die Verluste aber erheblich größer werden. Arsen und Antimon werden indessen praktisch nicht adsorbiert, sodaß diese Elemente bequem dadurch aufgefunden werden können, daß man einen salzsauren

Auszug durch Ultrafiltration reinigt und im Ultrafiltrat den Nachweis führt. Die Methode kann weiter empfohlen werden zur Auffindung solcher Gifte, die man bisher durch Dialyse dem Untersuchungsobjekt zu entziehen pflegte, wie Kaliumchlorat und Oxalsäure. Hier zeichnet sich die Methode durch schnelle Ausführbarkeit und Bequemlichkeit aus.

Verfolgung des Kaseinabbaues bei der Käsereifung mittels der Ultrafiltrationsmethode.

Die Veränderungen, welche das Kasein bei der Käsereifung erleidet, sind vielfach untersucht worden, allerdings mehr nach der bakteriologischen als nach der chemischen Seite hin. Immerhin weiß man, daß die chemischen Veränderungen derart vor sich gehen, daß aus dem wasserunlöslichen Kasein allmählich wasserlösliche Stickstoffverbindungen entstehen. Weiterhin ist festgestellt, daß dabei ein Abbau des Kaseins stattfindet, der über Albumosen und peptonartige Verbindungen teilweise bis zu Aminosäuren führt. Ferner tritt als Spaltungsprodukt Ammoniak auf. Man hat den Abbau des Kaseins bisher in der Weise analytisch verfolgt, daß man die in der Eiweißchemie üblichen Methoden, z. B. Fällung mit Phosphorwolframsäure, Aussalzen mit Zinksulfat u. s. w. zum Nachweis, bezw. zur Bestimmung und Trennung der wasserlöslichen Abbauprodukte benutzte. Es schien nicht aussichtslos, die Ultrafiltrationsmethode für den gleichen Zweck heranzuziehen. Denn aus dem wasserunlöslichen Kasein entstehen vermutlich zuerst lösliche hochmolekulare Verbindungen, die noch Kolloidcharakter besitzen, und erst durch weiteren Abbau dürften sich daraus Stoffe von kleinerem Molekulargewicht bilden, denen die Kolloidnatur abgeht. Diese fortschreitende Änderung im Kolloidcharakter der wasserlöslichen Abbauprodukte des Kaseins mußte sich mit der Ultrafiltrationsmethode verfolgen lassen.

In der Tat erwies sich die Methode als geeignet, einen Einblick in die bei der Käsereifung vorgehenden Zersetzungsprozesse zu gewinnen. Quark, den man auf die übliche Art reifen läßt, gibt an Wasser

zunächst nur wenig lösliche Stickstoffverbindungen ab. Allmählich wird aber der größte Teil des Gesamtstickstoffs wasserlöslich, aber nicht kontinuierlich, vielmehr findet an einem bestimmten Punkte ein plötzliches Ansteigen des wasserlöslichen Stickstoffs statt. In den ultrafiltrierten wässerigen Auszügen des reifenden Quarks ist durchweg nur ein Teil des wasserlöslichen Stickstoffs enthalten. Ein anderer Teil wird durch das Ultrafilter zurückgehalten. Die das Ultrafilter passierenden Stickstoffsubstanzen nehmen mit fortschreitender Reifung zu, aber sehr viel langsamer als die wasserlöslichen.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß käuflicher Quark der Reifung überlassen wurde. Von Zeit zu Zeit wurden 10 g entnommen, mit 500 ccm Wasser angerieben, einige Zeit stehen gelassen und durch ein dichtes Filtrierpapier filtriert. In 100 ccm des Filtrats wurde der wasserlösliche Stickstoff bestimmt. Ferner wurde das Filtrat mit Eiweißreagentien auf lösliche Eiweißstoffe geprüft. Ein Teil des filtrierten Auszuges wurde der Ultrafiltration unterworfen, im Ultrafiltrat ebenfalls der Stickstoff bestimmt und das Filtrat mit Eiweißreagentien geprüft. Es wurden stets Ultrafilter derselben Art verwendet mit 4 mg Nitrozellulose auf 1 qcm. Der Verlauf der Versuche ist aus nachstehender Tabelle zu ersehen.

Gesamtstickstoff im frischen Käse.

Etwa 2 g wurden nach Kjeldahl verbrannt. Der Stickstoffgehalt betrug im Mittel 3,785%.

Veränderungen der wasserlöslichen Stickstoffsubstanz beim Reifen.

Datum	Papierfiltrat	N in %	Ultrafiltrat	N in %
31. 5.		0,1412		0,063
Beginn des Versuchs	Tannin: leichte Fällg.		—	
	$(NH_4)_2SO_4$: —		—	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: —		—	
3. 6.		0,171		0,106
	Tannin: zieml. Fällg.		—	
	$(NH_4)_2SO_4$: kl. Fällg.		—	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: schw. Trübg.		—	

Datum	Papierfiltrat	N in %	Ultrafiltrat	N in %
5. 6.		0,220		0,125
	Tannin: sofort Fällg.		—	
	$(NH_4)_2SO_4$: deutl. Fällg.		—	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: n. 12 Std Fällg.		—	
11. 6.		3,099		1,138
geimpft mit altem Käse	Tannin: dicke Fällg.		Trübung	
	$(NH_4)_2SO_4$: deutl. Fällg.		Trübung	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: dicke Fällg.		—	
12. 6.		3,357		1,285
	Tannin: dicke Fällg.		deutl Fällg.	
	$(NH_4)_2SO_4$: starke Fällg.		zieml. Fällg.	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: starke Fällg.		g. schw. Trübung	

Wie die Tabelle zeigt, ist in der Zeit vom 5. 6. bis 11. 6. der größte Teil des Stickstoffs in plötzlichem Anstieg wasserlöslich geworden. Weil anfangs die Reifung (vom 31. 5. bis 5. 6.) sehr langsam vor sich ging, war nämlich mit etwas altem Käse geimpft worden. Dieser Zusatz von Ferment im Verein mit recht hohen Tagestemperaturen hatte die Reifung offenbar außerordentlich beschleunigt. Die ganze Masse war flüssig geworden. Die Versuche wurden deshalb in derselben Weise mit neuem Käse wiederholt.

Der Gesamtstickstoff im frischen Käse betrug 3,305%.

Veränderungen der wasserlöslichen Stickstoffsubstanz beim Reifen.

Datum	Papierfiltrat	N in %	Ultrafiltrat	N in %
24. 6.		0,191		0,075
Beginn des Versuchs	Tannin: schw. Trübg.		—	
	$(NH_4)_2SO_4$: —		—	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: —		—	
27. 6.		0,291		0,094
	Tannin: deutl. Fällg.		—	
	$(NH_4)_2SO_4$: schw. Fällg.		—	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: —		—	
30. 6.		0,369		0,0987
	Tannin: deutl. Fällg.		—	
	$(NH_4)_2SO_4$: kl. Fällg.		—	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: Trübung		—	

Datum	Papierfiltrat	N in %	Ultrafiltrat	N in %
2. 7.		1,989		0,0988
	Tannin: dicke Fällg.		g. schw. Trübg.	
	$(NH_4)_2SO_4$ „ „		—	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: „ „		—	
4. 7.		2,509		0,119
	Tannin: dicke Fällg.		schw. Trübg.	
	$(NH_4)_2SO_4$: „ „		—	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: „ „		—	
7. 7.		3,048		0,310
	Tannin: dicke Fällg.		Trübung	
	$(NH_4)_2SO_4$: „ „		—	
	Essigs und $FeCy_6K_4$: „ „		—	
14. 7.				0,512
	Tannin: dicke Fällg.		kl. Fällg	
	$(NH_4)_2SO_4$: „ „		Trübung	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: „ „		—	
21. 7.				0,9780
	Tannin: dicke Fällg.		kl. Fällg.	
	$(NH_4)_2SO_4$ „ „		Trübung	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: „ „		—	
6. 8.		3,161		0,9885
	Tannin: dicke Fällg.		deutl. Fällg.	
	$(NH_4)_2SO_4$: „ „		kl. Fällg.	
	Essigs. und $FeCy_6K_4$: „ „		—	

Der zweite Versuch ist ohne künstlichen Fermentzusatz und bei einer Temperatur von 12—15° durchgeführt worden. Die Reifung ist demgemäß gleichmäßiger und langsamer verlaufen. Zum Schluß des Versuchs befand sich der Käse immer noch im eßbaren Zustand. Die Tabelle zeigt wieder an einer Stelle das sprunghafte Ansteigen des wasserlöslichen Stickstoffs im Papierfiltrat von 0,369% auf 1,99% an. Gleichzeitig damit fängt die Reaktion mit Ferrocyankalium und Essigsäure an positiv zu werden. Im Ultrafiltrat zeigt sich dagegen an der gleichen Stelle kein sprunghaftes Ansteigen, vielmehr ist es gleichmäßiger, im Anfang etwas langsamer, später schneller. Die Reaktion mit Essigsäure und Ferrocyankalium bleibt im Ultrafiltrat dauernd negativ, während mit Tannin allmählich schwache Reaktion und beim Aussalzen mit Ammon-

sulfat leichte Fällung eintritt. Es waren zum Schluß etwa 95% des Gesamtstickstoffs wasserlöslich geworden, während im Ultrafiltrat keine 30% des Gesamtstickstoffs vorhanden waren.

Der Abbau des Kaseins erfolgt also zunächst zu wasserlöslichen Verbindungen, die noch Kolloidcharakter zeigen, und zwar verläuft dieser Prozeß ziemlich rasch. Sehr viel langsamer geht der Zerfall der wasserlöslichen kolloiden Stickstoffsubstanzen in Stoffe vor sich, die ultrafiltrierbar sind, d. h. Eiweißnatur nicht mehr besitzen.

Wie sich aus den vorstehenden Versuchen ergibt, ist die Ultrafiltrationsmethode wohl geeignet, einen Einblick in die bei der Reifung des Käses sich abspielenden Vorgänge zu gewinnen. Das beigebrachte Material ist zwar gering, läßt aber doch schon erkennen, daß auf diesem Wege noch manches zu erreichen sein wird. Es läßt sich jetzt schon sagen, daß z. B. die Ultrafiltrationsmethode es wahrscheinlich ermöglichen wird, analytische Daten dafür zu gewinnen, wie weit der Reifegrad eines Käses fortgeschritten ist, und ob die Reifung normal verlaufen ist. Beides ist unter Umständen für die Beurteilung des Käses von Bedeutung, und eine Methode, welche diese Verhältnisse aufzuklären vermag, würde in der Nahrungsmittelchemie entschieden von Wert sein.

Lebenslauf.

Am 13. Juli 1895 wurde ich als Tochter des Malers Heinrich Wipperling in Elberfeld geboren. Von Ostern 1902 bis Ostern 1910 besuchte ich das Lyzeum-Ost zu Elberfeld und daran anschließend einen Elberfelder Realgymnasialkursus für Mädchen. Ostern 1914 bestand ich am Realgymnasium zu Remscheid die Reifeprüfung. Von Oktober 1914 an studierte ich drei Semester Mathematik und Naturwissenschaften, davon die beiden ersten in Bonn, das dritte in Heidelberg. Die folgenden sieben Semester studierte ich Chemie, Physik und Botanik und zwar bis Herbst 1916 in Heidelberg und von da an bis Herbst 1919 in Göttingen. Dort machte ich Pfingsten 1917 das anorganische, Anfang Februar 1918 das organische Verbandsexamen. Außerdem legte ich Ende Januar 1918 die Vorprüfung für Nahrungsmittelchemiker ab.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren und Dozenten, in Bonn: Anschütz, Becker, Benrath, Clemen, Kayser, London, Verweyen; in Heidelberg: Curtius, Jannasch, Klebs, Koehler, Königsberger, Lenard, Müller, Wobbermin, Wolf; in Göttingen: Berthold, Bertholet, Borsche, Coehn, Hoffmann, Mannich, Tammann, Traubenberg, Windaus, Zsigmondy.

Besonders Herrn Prof. Dr. Mannich möchte ich an dieser Stelle für die Anregung zu vorliegender Arbeit und seine freundliche Unterstützung meinen Dank aussprechen.